



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K 31/425</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40832</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. November 1997 (06.11.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00820</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 24. April 1997 (24.04.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 16 486.9 25. April 1996 (25.04.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). ROSCHE, Fred [DE/DE]; Benndorfer Strasse 18a, D-06184 Dieskau (DE). SCHMIDT, Jörn [DE/DE]; Elchendorffstrasse 2, D-06114 Halle (DE). PAULY, Robert, P. [CA/CA]; 2631 Fairview Crescent, Vancouver, British Columbia V6T 2B8 (CA). MCINTOSH, Christopher, H., S. [CA/CA]; 605-2233 Allison Road, Vancouver, British Columbia V6T 1T7 (CA). PEDERSON, Ray, A. [CA/CA]; 3876 West 23rd Avenue, Vancouver, British Columbia V6S 1K9 (CA).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

PTO 2002-3429

S.T.I.C. Translations Branch

(54) Title: USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSESPIEGELS IN SÄUGERN

(57) Abstract

The invention relates to the use of a method in which by reducing in the blood of a mammal by administration of effectors the enzyme activity of dipeptidyl peptidase (DP IV) or enzyme activity similar to DP IV, the endogenous (or additionally exogenously administered) insulinotropic peptide gastric inhibitory polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) and glucagon-like peptide amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆) (or similarly GLP-1₇₋₃₇ or analogues thereof) are decomposed in a causal sequence to a reduced extent by DP IV enzymes or those similar to DP IV. Consequently, the fall in the concentration of said peptide hormones or the analogues thereof is reduced or retarded. The increased stability, achieved by the action of DP IV effectors, of the incretine or the analogues thereof which are available endogenously or exogenously and consequently provided in increased numbers for insulinotropic stimulation of the incretine receptors of the Langerhans cells in the pancreas, changes the power of endogenous insulin thereby stimulating the metabolism of carbohydrates in the treated organism. The blood sugar level therefore drops below the glucose concentration, characteristic of hyperglycaemia, in the serum of the treated organism. Metabolic anomalies such as glucosuria, hyperlipidemia, possible serious metabolic acidosis, *diabetes mellitus*, which result from higher concentrations of glucose in the blood over a longer period of time, are prevented or alleviated. The method according to the invention is a novel way of lowering high blood glucose concentrations. It is simple, commercially applicable and suitable for use in human medicine for treating, in particular diseases caused by above-average blood glucose levels.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆) (o.a. GLP-1₇₋₃₇ oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, *Diabetes mellitus*, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSE-SPIEGELS IN SÄUGERN

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration mit Hilfe von aktivitätsmindernden *Effektoren* (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. and BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRÄUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701 (1987)]. Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖN, E., *Histochem.* 82, 41 (1987)].

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für pro-linspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 (1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophylin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

2

Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., *FEBS-Letters* 260, 131 (1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C.E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., *J. of Immunology* 144, 2908 (1990)].

Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen können wie strukturanaloge Prolin-haltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alanin-haltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆), Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch *Incretine*), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in situ* abspalten kann [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829 (1993)].

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

3

Substrate *in vivo* kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Z. B. basiert *Diabetes mellitus* Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind [BROWN, J.C., DAHL, M., KAWAK, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C. and PEDERSON, R.A. *Peptides* 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B. KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the inulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. *Diabetologia* 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B.B., KNUDSEN, L.B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 296, 6275 (1994)].

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, als auch die moderneren Verfahren zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche *i.v.* Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

4

des Immunsystems [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. *Sci. Americ.* 273 (1) 40-46 (1995)].

Die möglichst orale Applikation hochaffiner, niedermolekularer Enzyminhibitoren dagegen ist eine kostengünstigere Alternative z. B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Derartige Enzyminhibitoren finden inzwischen therapeutischen Einsatz als Immunsuppressiva, Antithrombotika und als AIDS-Virostatika. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearance-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACK, W.J., HATCH, S.D., MUESING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S., CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. *Bioorg. Medicinal Chem. Letters* 5 (23) 2897 (1995)].

Das Ziel der Erfindung ist ein einfaches und neuartiges Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels, das erfindungsgemäß dadurch erreicht werden kann, daß mittels Verabreichung von Effektoren an einen Säugerorganismus, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆ (o.a. GLP-1₇₋₃₇ oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) zur Folge hat, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann.
2. erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat.

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

5

3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in nachfolgender Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

- 5 Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase VI (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität. Zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säugern der Verhinderung oder Milderung pathologischer
- 10 Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidaemie, metabolischer Azidosen und Diabetes Mellitus. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge eines Effektos der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.
- 15

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-Analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

20

- Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP
- 25 IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika Alanyl-Pyrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine
- 30 proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249 (1990)] oder in Analogie zu den in der Literatur be-

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

6

schriebenen Methoden herstellbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden in Form von pharmazeutischen Präparaten enthaltend den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien verabreicht. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. *i.v.*, in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z. B. kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolididen ein solcher Dosisbereich zwischen 1.0 mg und 10.0 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen.

15

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

7

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Incretine GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆ in situ

5

Sowohl *in vitro* mit gereinigtem Enzym als auch *in situ*, z.B. in gepooltem humanem Serum, kann man die Hydrolyse der Incretine, verursacht durch DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität, nachweisen bzw. mit Hilfe von Inhibitoren unterdrücken (Abb. 1).

Erfindungsgemäß erreicht man *in situ* bei Inkubation von 30 µM GIP₁₋₄₂ bzw. 30 µM GLP-1₇₋₃₆ und 20 µM Isoleucyl-Thiazolidid (1a), einem reversiblen DP IV-Inhibitor in 20 %igem Serum bei pH 7.6 und 30 °C die komplette Unterdrückung der Enzym-katalysierten Hydrolyse beider Peptid-hormone innerhalb von 24 Stunden (1b und 1c, jeweils obere Spektren. Synthetisches GIP₁₋₄₂ (5 µM) und synthetisches GLP-1₇₋₃₆ (15 µM) wurden mit humanem Serum (20 %) in 0.1 mM TRICINE Puffer bei pH 7.6 und 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Proben der Inkubationsansätze (für GIP₁₋₄₂ 2.5 pmol und im Falle von GLP-1₇₋₃₆ 7.5 pmol) wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden mit 2',6'-Dihydroxyacetophenon als Matrix co-kristallisiert und mittels MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert. Die Spektren (Abb. 1) stellen Akkumulationen von 250 einzelnen Laserschüssen pro Probe dar.

(1b) Die Signale im Bereich von m/z 4980.1 ± 5.3 entsprechen GIP₁₋₄₂ (M 4975.6) und m/z 4745.2 ± 5.5 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GIP₃₋₄₂ (M 4740.4).

(1c) Die Signale m/z 3325.0 ± 1.2 entsprechen GLP-1₇₋₃₆ (M 3297.7) und m/z 3116.7 ± 1.3 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GLP-1₉₋₃₆ (M 3089.6).

In den Versuchsansätzen ohne Inhibitor wurden die Incretine in dieser Zeit fast vollständig abgebaut (Abb. 1b und 1c, jeweils untere Spektren).

25

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

8

Beispiel 2: Inhibierung des Abbaus von GLP-1₇₋₃₆ durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid in vivo.

- Verfolgt man den Metabolismus der nativen Incretine (hier GLP-1₇₋₃₆) im Serum der Ratte in
- 5 Abhängigkeit in Gegenwart des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid (*i.v.* Injektion einer 1.5 µM Inhibitorlösung in 0.9 %-iger Kochsalzlösung) gegenüber einer Kontrolle, so ist bei einer Konzentration des Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid von ca. 0.1 mg/kg Laborratte bei den Inhibitor-behandelten Versuchstieren (n = 5) im Verlaufe des Versuchszeitraums kein Abbau des insulinotropen Peptidhormons GLP-1₇₋₃₆ zu beobachten (Abb. 2).
- 10 Zur Detektion der Metaboliten in Anwesenheit und Abwesenheit des DP IV-Inhibitors (20 Minuten nach vorheriger *i.v.*-Inhibitor- bzw. Kochsalzgabe) erhielten die Versuchs- und Kontrolltiere *i.v.* 50 - 100 pM ¹²⁵I-GLP-1₇₋₃₆ (spezifische Aktivität ca. 1 µMCi/pM). Blutproben wurden nach 2 - 5 min entnommen und das Plasma mittels 20 % Acetonitril extrahiert. Nachfolgend wurde der Peptidextrakt mittels RP-HPLC separiert und die Radioaktivität der Fraktionen an einem γ-Counter analysiert. Die gefundene Aktivität ist in cpm (*counts per minute*
- 15 relativ zum Maximum angegeben).

Beispiel 3: Modulation der Insulinwirkung und Senkung des Blutglukosespiegels nach i.v. Applikation des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid in vivo.

20

- An der durch intraduodenale (*i.d.*) Injektion Glukose-stimulierten Ratte, kann durch *i.v.* Gabe verschiedener DP IV-Effektoren, z. B. von 0.1 mg Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte eine auf die Inhibitorwirkung zurückgehende, zeitlich verzögert einsetzende Senkung des Glukosespiegels beobachtet werden. Dieser Effekt ist dosisabhängig und nach Absetzen der Infusion
- 25 von 0.05 mg/min des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte reversibel. Die *i.v.* Applikation der gleichen Glukosemenge von Inhibitor-behandelten und Kontroll-Tieren zeigt im Gegensatz zur den *i.d.* Glukose-stimulierten Versuchstieren keine vergleichbare Wirkung.
- Abbildung 3 verdeutlicht diese Zusammenhänge an den Inhibitor-abhängigen Veränderungen der Plasmaparameter: A - DP IV-Aktivität, B - Plasma-Insulinspiegel, C - Blutglukosespiegel.

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

9

Die Versuchstiere ($n = 5$, männliche Wistar-Ratten, 200-225 g) erhielten als Initialdosis 1.5 μM Isoleucyl-Thiazolidid in 0.9 %-iger Kochsalzlösung (\blacktriangle) oder gleiche Volumina 0.9%-ige Kochsalzlösung ohne Inhibitor (\blacksquare) (Kontrollgruppe $n = 5$). Die Versuchsgruppe erhielt weiterhin eine Infusion des Inhibitors von 0.75 $\mu\text{M}/\text{min}$ über 30 min Versuchszeit (*).

- 5 Der Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitraum eine Inhibitor-freie 0.9%-ige Kochsalzlösung infundiert. Zum Zeitpunkt $t=0$ erhielten die Tiere *i.d.* eine Glukosedosis von 1g/kg 40%-iger Dextroselösung (w/v).

Allen Versuchstieren wurden Blutproben in zehn Minutenabständen entnommen.

- Glukose Messungen erfolgten am Vollblut (Lifescan One Touch II analyzer) während die DP
10 IV-Aktivität und die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt wurden.

- Der hier angewandte Insulintest ist empfindlich zwischen 10 und 160 mU/ml [PEDERSON, R.A., BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B. & BROWN, J.C. *Reg. Peptides*. 3, 53-63 (1982)]. Die DP IV-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit
15 Standardabweichung angegeben.

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

Patentansprüche

1. Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischer Azidosen und *Diabetes mellitus* dient.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.
4. Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

WO 97/40832

1/3

PCT/DE97/00820

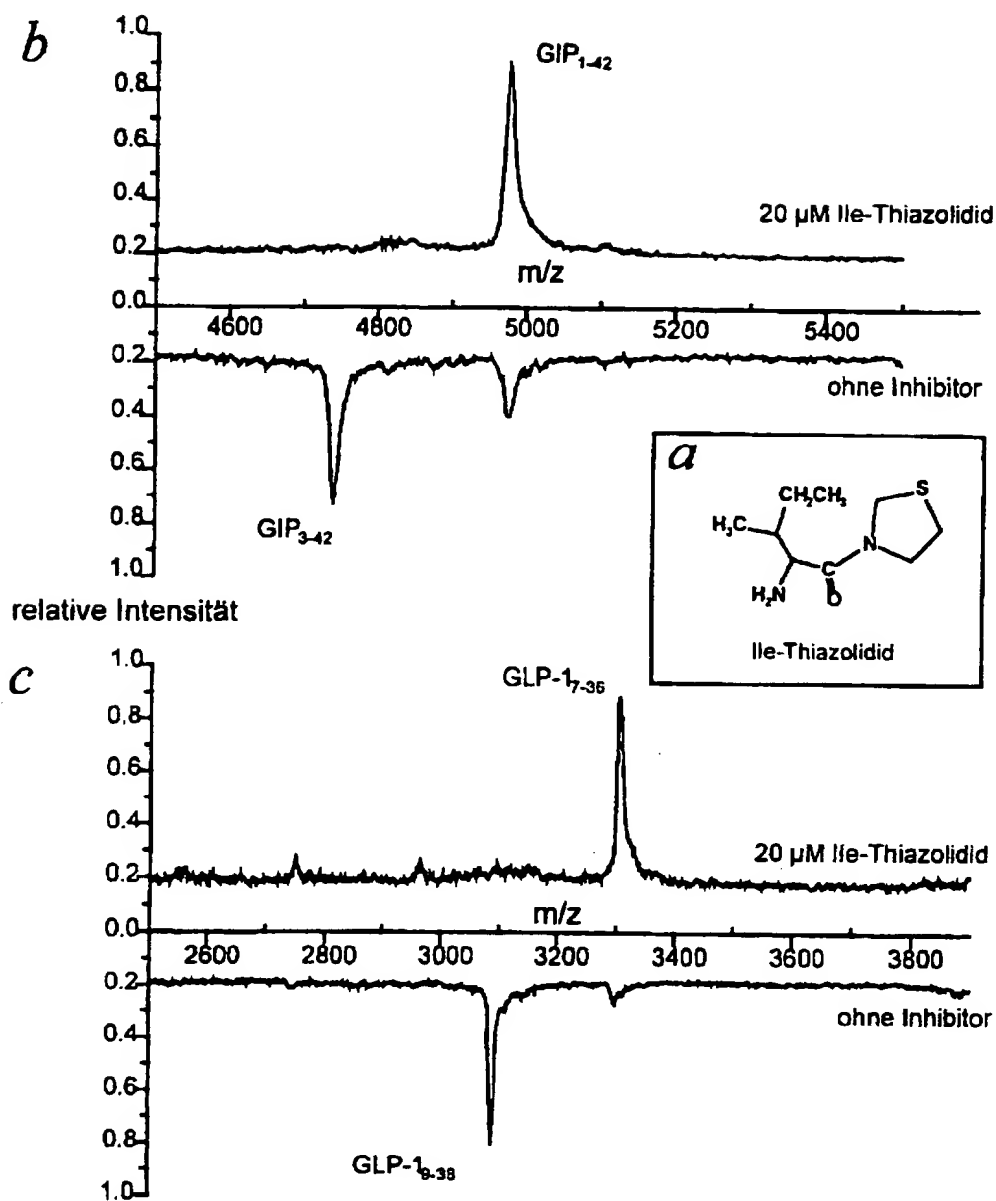


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP₁₋₄₂ (b) und GLP-₇₋₃₆ und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

2/3

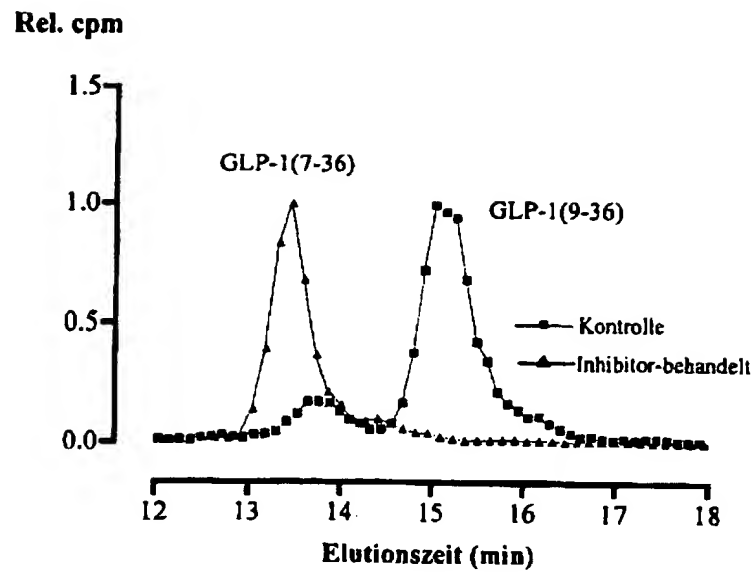


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.

WO 97/40832

PCT/DE97/00820

3/3

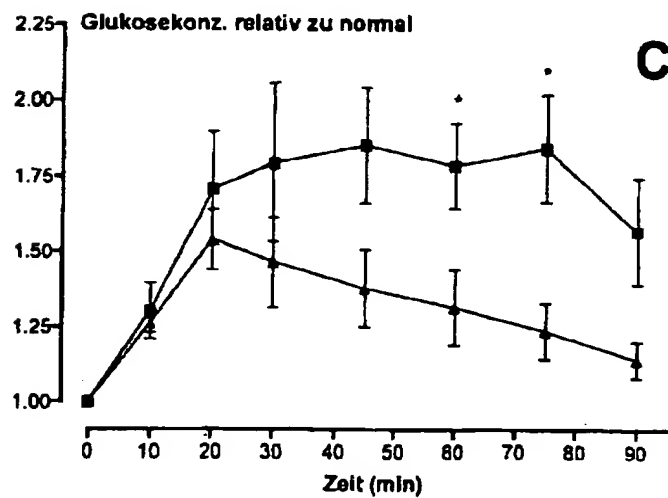
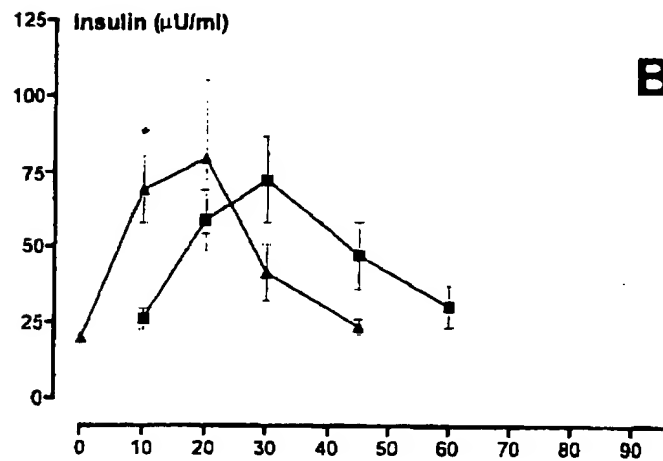
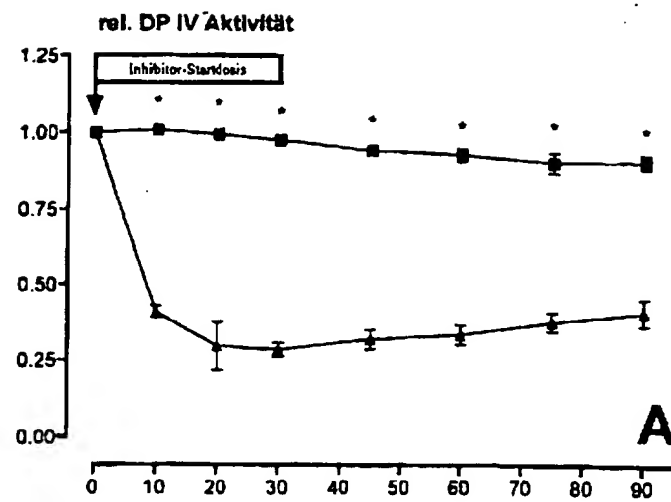


Abb. 3: Einfluß des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der *i.d.*-Glukose-stimulierten Ratte.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/DE 97/00820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/425

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H.-U. DEMUTH: "Recent developments in inhibiting cysteine and serine protease." J. ENZYME INHIB., vol. 3, no. 4, 1990, pages 249-278, XP002041620 cited in the application	
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, vol. 136, no. 8, 1995, pages 3585-3597, XP002041621	

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 September 1997

Date of mailing of the international search report

13.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/DE 97/00820

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21 November 1991 see abstract ---	
A	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24 August 1995 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patient family members

Internal Application No.

PCT/DE 97/00820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 A	29-08-95
		AU 681251 B	21-08-97
		AU 1718195 A	04-09-95
		EP 0754454 A	22-01-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/00820

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/425

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfobjekt (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfobjekt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	H.-U. DEMUTH: "Recent developments in inhibiting cysteine and serine protease." J. ENZYME INHIB., Bd. 3, Nr. 4, 1990, Seiten 249-278, XP002041620 in der Anmeldung erwähnt	
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, Bd. 136, Nr. 8, 1995, Seiten 3585-3597, XP002041621	

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. September 1997

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

13.10.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Klaver, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21. November 1991 siehe Zusammenfassung ---	
A	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24. August 1995 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00820

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 A	29-08-95
		AU 681251 B	21-08-97
		AU 1718195 A	04-09-95
		EP 0754454 A	22-01-97

PTO 02-3429

CY=WO DATE=19971106 KIND=A1
PN=97/40832

USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS FOR LOWERING
THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS
[Verwendung von Dipeptidyl Peptidase IV Hemmer zur Senkung des
Blutglukosespiegels in Säugern]

Hans-Ulrich Demuth, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. July 2002

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10):	WO
DOCUMENT NUMBER	(11):	97/40832
DOCUMENT KIND	(12):	A1
	(13):	APPLICATION
PUBLICATION DATE	(43):	19971106
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	PCT/DE97/00820
APPLICATION DATE	(22):	19970424
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	A 61 K 31/425
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	DE
PRIORITY NUMBER	(31):	196 16 486.9
PRIORITY DATE	(32):	19960425
INVENTOR	(72):	Demuth, H.-U.; Rosche, F.; Schmidt, J.; Pauly, R.; McIntosh, C.; Pederson, R.
APPLICANT	(71):	Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung E. V.
TITLE	(54):	USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS
FOREIGN TITLE	[54A]:	Verwendung von Dipeptidyl Peptidase IV Hemmer zur Senkung des Blutglukosespiegels in Säugetieren

The invention relates to a simple process for reducing the /1*
blood sugar concentration using activity-reducing *effectors*
(substrates, pseudosubstrates, inhibitors, binding proteins,
antibodies, etc.) for enzymes with comparable or identical activity
to the enzymatic activity of the enzyme dipeptidyl peptidase IV.

In addition to proteases that are included in proteolysis,
which ultimately causes the breakdown of proteins to form amino
acids, regulatory proteases are also known that participate in the
functionalization (activation, deactivation, modulation) of
endogenous peptide agents [Kirschke, H., Langner, J., Riemann, S.,
Wiederanders, B., Ansorge, S., and Bohley, P., Lysosomal Cysteine
Proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15
(1980); Kräusslich, H.-G. and Wimmer, E., Viral Proteinases, *Ann.*
Rev. Biochem. 57, 701 (1987)]. A number of such so-called
convertases, signal peptidases, or enkephalinases have been
discovered, particularly in conjunction with immune research and
neuropeptide research [Gomez, S., Gluschankov, P., Lepage, A.,
Marrakchi, N., and Cohen, P., *Proc. natl. Acad. Sci USA*, 85, 5468
(1988); Ansorge, S. and Schön, E., *Histochem.* 82, 41 (1987)].

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

Due to the frequent occurrence of the amino acid proline in a number of peptide hormones and the structural properties of this peptide, a function analogous to the signal peptidases has been discussed for proline-specific peptidases [Yaron, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); Walter, R., Simmons, W. H., and Yoshimoto, T. Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 (1980); Vanhoof, G., Goosens, F., De Meester, I., Hendriks, D., and Scharpé, S. Proline Motifs and their Biological Processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Because of its particular structure, proline determines both conformation and stability in these peptides, since it protects them from decomposition by nonspecific proteases [Kessler, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden [Conformation and Biological Effect of Cyclic Peptides], *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. On the other hand, enzymes that act on proline-containing sequences in a highly specific, structure-altering manner (HIV protease, cyclophilin, etc.) are attractive objects of the current research on possible agents. For the proline-cleaving peptidases prolyl endopeptidase (PEP) and dipeptidyl peptidase IV (DP IV), in particular, links between modulation of the biological activity of

natural peptide substrates and their selective cleavage by these enzymes have been shown to be probable. Thus, it is assumed that PEP plays a role in learning and in the memory process and that DP IV is involved in signal transduction during immune response [Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata K., and Sugita, H., *FEBS-Letters* 260, 131 (1990), Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C. E., Stein, H., and Fleischer, B., *Journal of Immunology* 144, 2908, (1990)].

Similar to the extraordinary proline-specificity of these enzymes, their high selectivity for the amino acid alanine at typical recognition sites in substrates is also being discussed, whereby alanine-containing peptides can take up similar conformations as structurally analogous proline-containing peptides. Recently, such properties of alanine-containing peptide chains were demonstrated by point mutation (replacement of proline with alanine) [Dodge, R. W. and Scheraga, H. A., Folding and Unfolding Kinetics of the Proline-to-Alanine Mutants of Bovine Pancreatic Robonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

DP IV and DP IV-analog activity (e.g., the cytosolic DP II possesses a substrate specificity virtually identical to that of DP IV) occurs in the blood circulation, where it splits off

dipeptides from the N-terminal of biologically active peptides in a highly specific manner, if proline or alanine is the neighboring residue of the N-terminal amino acid in the sequence.

Consequently, it is assumed that this enzyme participates in the regulation of polypeptides *in vivo* [Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., and Scharpé, S., Proline Motifs and their Biological Processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

The glucose-dependent insulintropic polypeptides: gastric inhibitory polypeptide 1-42 (GIP₁₋₄₂) and glucagon-like peptide amide-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆), hormones that stimulate glucose-induced insulin secretion of the pancreas (also called *incretins*), are substrates of DP IV, since they can split off the dipeptide tyrosinyl-alanine or histidyl-alanine from the N-terminal sequences of these peptides *in vitro* and *in situ* [Mentlein, R., Gallwitz, B., and Schmidt, W. E., Dipeptidyl Peptidase IV Hydrolyzes Gastric Inhibitory Polypeptide, Glucagon-Like Peptide-1(7-36)amide, Peptide Histidine Methionine and Is Responsible for their Degradation in Human Serum. *Eur. J. Biochem* 214, 829 (1993)].

The reduction of the enzymatic activity such DP IV and DP IV analogs in the cleavage of such substrates *in vivo* can help /3
effectively suppress unwanted enzymatic activity under laboratory

conditions as well as in pathological states in mammal organisms [Demuth, H.-U., Recent Developments in the Irreversible Inhibition of Serine and Cysteine Proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); Demuth, H.-U. and Heins, J., On the Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidases IV in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.), R. G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. For example, *Diabetes mellitus* (type II) (also called adult-onset diabetes) is based on reduced insulin secretion or disturbances in the receptor function that result, among other things, from proteolytically related concentration anomalies [Brown, J. C., Dahl, M., Kwawk, S., McIntosh, C. H. S., Otte, S. C., and Pederson, R. A. *Peptides* 2, 241 (1981); Schmidt, W. E., Siegel, E. G., Gallwitz, B., Kummel, H., Ebert, R., and Creutzfeldt, W., Characterization of the Inulinotropic Activity of Fragments Derived from Gastric Inhibitory Polypeptide. *Diabetologia* 29, 591A (1986); Adelhorst, K., Hedegaard, B. B., Knudsen, L. B., and Kirk, O. Structure-Activity Studies of Glucagon-Like Peptide. *J. Biol. Chem.* 296, 6275 (1994)]

In the current state of the art, hyperglycemia and related causes and/or aftereffects (including *diabetes mellitus*) are

treated by the administration of insulin (e.g., using material from isolated from bovine pancreas or produced by genetic engineering) to the sick organism in various forms of administration. All the known methods, including the recent ones, are characterized by high material costs, significant expenses, and frequently a significant worsening of the patient's quality of life. The classic method (daily i.v. insulin injection, common since the 1930's) treats the acute symptoms of the disease, but after prolonged usage it leads to severe vascular changes (arteriosclerosis) and nerve damage [Lacy, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

Recently, the installation of subcutaneous depot implants (the insulin is dispensed and there is no need for daily injections) and the implantation (transplantation) of intact Langerhans cells into the nonfunctional pancreatic gland or other organs and tissues have been proposed. Such transplants use expensive technology. Moreover, they represent risky surgery on the recipient organism and, in the case of cell transplantation, they also require methods of suppressing or bypassing the immune system [Lacy, P., Treating /4 Diabetes with Transplanted Cells. *Sci Americ.* 273 (1) 40-46 (1995)].

The preferably oral administration of high-affine, low-molecular enzyme inhibitors, on the other hand, is a cost-efficient alternative, for example, to invasive surgical techniques for the treatment of pathological manifestations. Such enzyme inhibitors are already used therapeutically as immunosuppressants, antithrombotics, and AIDS virostatics. By chemical design of their stability, transport, and clearance properties, their action can be modified and adapted to certain individual characteristics [Sandler, M. and Smith, H. J., Eds., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford (1989); Munroe, J. E., Shepherd, T. A., Jungheim, L. N., Hornback, W. J., Hatch, S. D., Muesing, M. A., Wiskerchen, M. A., Su, K. S., Campanale, K. M. Baxter, A. J., and Colacino, J. M., Potent, Orally Bioavailable HIV-1 Protease Inhibitors Containing Noncoded D-Amino Acids. *Bioorg. Medicinal Chem. Letters* 5 (23), 2,897 (1995)].

The object of the invention is a simple and new process for reducing the blood glucose level which, in accordance with this invention, is achieved in that, by administering effectors to a mammal organism, the endogenous (or additionally exogenously administered) insulinitropic peptides GIP₁₋₄₂ and GLP-1₇₋₃₆ (or similarly GLP-1₇₋₃₇ or analogs thereof) are decomposed in a causal

sequence to a reduced extent by DP IV enzymes or those similar to DP IV, thereby reducing or retarding the fall in the concentration of these peptide hormones or the analogs thereof.

The invention is based on the surprising finding that a reduction in the DP IV or DP IV-like enzymatic activity acting in the blood circulation has a causal influence on the blood sugar level. It was found that:

1. The reduction in DP IV or DP IV-analog activity results in a relative increase in stability of the glucose-stimulated or exogenous incretins (or analogs thereof), i.e. by administering DP IV or DP IV-analogous proteins, it is possible to control incretin breakdown in the blood.

2. Increased biological stability in the breakdown of incretins (or analogs thereof) changes the action of endogenous insulin.

3. The increased stability in the incretin brought about by /5 the reduction in DP IV or DP IV-analog enzymatic activity in the blood results in a subsequent change in the glucose-induced insulin action, thus leading to modulation in the blood glucose level that is controllable with DP IV effectors.

Thus, the invention relates to the use of effectors of dipeptidyl peptidase VI (DP IV or DP IV-analog enzyme activity) to reduce the blood sugar level to below the glucose concentration in characteristic of hyperglycemia in the serum of mammal organisms. In particular, the invention relates to the use of effectors of DP IV or DP IV-analog enzymatic activity in mammals to prevent or reduce pathological metabolic anomalies in the mammal organism, such as glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidosis, and diabetes mellitus. In an additional preferred embodiment, the invention relates to a process for reducing the blood sugar level to below the glucose concentration characteristic of hyperglycemia in the serum of a mammal organism, characterized in that the mammal organism is given a therapeutically active quantity of an effector of DP IV or DP IV-analog enzymatic activity.

In a second preferred embodiment, the invention relates to effectors of DP IV or DP IV-analog enzymatic activity for use in a process for reducing the blood sugar level to below the glucose concentration characteristic of hyperglycemia in the serum of a mammal organism.

The effectors of DP IV or DP IV-analog enzymes administered in accordance with this invention can be used in pharmaceutically

applicable formulated complexes as inhibitors, substrates, pseudosubstrates, inhibitors of DP IV expression, binding proteins, or antibodies of these enzyme proteins or combinations of the various substances that reduce the DP IV or DP IV-analog protein concentration in mammals. Effectors made in accordance with this invention include, for example, DP IV inhibitors such as the dipeptide derivatives or dipeptide mimetics alanyl pyrolidide, isoleucyl thiazolidide, and the pseudosubstrate N-valyl prolyl, O-benzoyl hydroxylamine. Such compounds are known from the literature [Demuth, H.-U., Recent Developments in the Irreversible Inhibition of Serine and Cysteine Proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249 (1990)] or may be produced by methods similar to those in the literature. /6

The process in accordance with this invention represents a new approach to reducing elevated blood glucose concentrations in the serum of mammals. It is simple, commercially viable, and suitable for use in therapy, particularly in human medicine for illnesses that result from above-average blood sugar values.

The effectors are administered in the form of pharmaceutical preparations containing the active ingredient in combination with conventional vehicles known from the state of the art. For

example, it is administered parenterally (e.g., i.v. in physiological saline solution) or enterally (e.g., orally, formulated with conventional vehicles such as glucose).

Depending on their endogenous stability and their bioavailability, the effectors must be administered in single or multiple doses in order to achieve the desired normalization of the blood glucose value. For example, in the case of aminoacyl thiazolidides the dosage may lie in the range of 1.0 mg to 10.0 mg effector per kilogram.

Exemplary Embodiments

/1

Example 1: Inhibition of DP IV-catalyzed hydrolysis of incretins

GIP₁₋₄₂ and GLP-1₇₋₃₆ in situ

The hydrolysis of incretins, caused by DP IV or DP IV-analog activity can be demonstrated or inhibited with the help of inhibitors, both *in vitro* with purified enzyme and *in situ*, for example in pooled human serum (Fig. 1).

In accordance with this invention, complete inhibition of the enzyme-catalyzed hydrolysis of both peptide hormones is achieved within 24 hours (1b and 1c, top spectra) *in situ* by incubating 30 μ M GIP₁₋₄₂ or 30 μ M GLP-1₇₋₃₆ and 20 μ M isoleucyl thiazolidide (1a), a reversible DP IV inhibitor, in 20% serum at pH 7.6 and

30°C. Synthetic GIP₁₋₄₂ (5 µM) and synthetic GLP-1₇₋₃₆ (15 µM) were incubated for 24 hours with human serum (20%) in 0.1 mM tricine buffer at pH 7.6 and 30°C. Samples of the incubation preparation (2.5 pmol of GIP₁₋₄₂ and 7.5 pmol in the case of GLP-1₇₋₃₆) were taken after various times. The samples were cocrystallized with 2',6'-dihydroxyacetophenone as a matrix and analyzed by MALDI-TOF mass spectroscopy. The spectra (Fig. 1) represent accumulations of 250 individual laser shots per sample.

(1b) The signals in the region of m/z 4980.1 ± 5.3 correspond to GIP₁₋₄₂ (M 4975.6) and m/z 4745.2 ± 5.5 to the DP IV hydrolysis product GIP₃₋₄₂ (M 4740.4).

(1c) The signals m/z 3325.0 ± 1.2 correspond to GLP-1₇₋₃₆ (M 3297.7) and m/z 3116.7 ± 1.3 to the DP IV hydrolysis product GLP-1₉₋₃₆ (M 3089.6).

In the test preparations without inhibitor, the incretins were almost completely broken down during this period of time (Figures 1b and 1c, bottom spectra).

Example 2. Inhibition of the breakdown of GLP-1₇₋₃₆ by the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide in vivo /8

Observation of the metabolism of native incretins (GLP-1₇₋₃₆ in this case) in the serum of rat in the presence of the DP IV

inhibitor isoleucyl thiazolidide (i.v., injection of a 1.5 μ M inhibitor solution in 0.9% saline solution) compared to controls reveals that at a concentration of the inhibitor isoleucyl thiazolidide of ca. 0.1 mg/kg lab rat, no decomposition of the insulinotropic peptide hormone GLP-1₇₋₃₆ is observed (Fig. 2) in the inhibitor-treated test animals (n=5).

For detecting the metabolites in the presence and absence of the DP IV inhibitor (20 minutes after the i.v. administration of inhibitor or saline solution), the test and control animals were given 50 - 100 pM ¹²⁵I-GLP-1₇₋₃₆ (specific activity ca. 1 μ MCi/pM) i.v. Blood samples were taken 2 - 5 minutes and the plasma was extracted with 20% acetonitrile. Then the peptide extract was separated with RP-HPLC and the radioactivity of the fractions analyzed with a gamma counter. The activity that was found is indicated in cpm (counts per minute), relative to the maximum.

Example 3. Modulation of the insulin action and reduction in blood glucose level following i.v. administration of the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide

In rat stimulated by intraduodenal (i.d.) injection of glucose, i.v. administration of various DP IV effectors, such as 0.1 mg isoleucyl thiazolidide per kg rat, can result in a

temporarily delayed reduction in the glucose level, due to inhibitor action. This effect is dosage-dependent and is reversible after stopping the infusion of 0.05 mg/min of the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide per kg rat. Unlike with the i.d. glucose-stimulated test animals, no similar effect was found after i.v. administration of the same glucose quantity in inhibitor-treated and control animals.

Figure 3 illustrates these relationships, showing the inhibitor-dependent changes in the plasma parameters: A -DP IV activity, B - plasma insulin level, C - blood glucose level. The test animals (n=5, male Wistar rats, 200-225 g) were given an initial dose of 1.5 μ M isoleucyl thiazolidide in 0.9% saline solution (Δ) or equal volumes of 0.9% saline solution without inhibitor (\boxtimes) (control group, n=5). The test group also received an infusion of the inhibitor of 0.75 μ M/min for the 30-minute test period (*). During that same period, the control group was infused with an inhibitor-free 0.9% saline solution. At time t=0 the animals received i.d. a glucose dosage of 1 g/kg 40% dextrose solution (w/v).

Blood samples were taken from all test animals at 10-minute intervals. Glucose measurements were made using whole blood

(Lifescan One Touch II analyzer), while the DP IV activity and the insulin concentrations were determined in the plasma.

The insulin test used here is sensitive between 10 and 160 mU/ml [Pederson, R. A., Buchan, A. M. J., Zahedi-Ash, S., Chen, C. B., and Brown, J. C. *Reg. Peptides*. 3, 53-63 (1982)]. The DP IV activity was determined spectrophotometrically [Demuth, H.-U. and Heins, J. On the Catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV, in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.). R. G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. All measured values are indicated as mean values with their standard deviations.

Claims

/10

1. The use of effectors of dipeptidyl peptidase (DP IV) and DP IV-analog enzyme activity to reduce the blood sugar level to below the glucose concentration characteristic of hyperglycemia in the serum of a mammal organism.

2. The use as recited in Claim 1, characterized in that the administration of effectors of DP IV or DP IV-analog enzyme activity in mammals serves to prevent or reduce pathological metabolic anomalies in mammal organisms, such as glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidosis, and *diabetes mellitus*.

3. The use as recited in Claim 1, characterized in that inhibitors, substrates, pseudosubstrates, inhibitors of DP IV expression, binding proteins, or antibodies of these enzyme proteins or combinations of the above-mentioned effectors are used as effectors of dipeptidyl peptidase (DP IV) and DP IV-analog enzyme activity.

4. Effectors of DP IV or DP IV-analog enzyme activity for use in a process for reducing the blood sugar level to below the glucose concentration characteristic of hyperglycemia in the serum of mammal organisms.

Figure 1. MALDI-TOF analysis of DP IV-catalyzed hydrolysis of GIP₁₋₄₂ (b) and GLP-1₇₋₃₆ and their inhibition by isoleucyl thiazolidide (a)

Key:

- (a) 20 μ M lle-thiazolidide;
- (b) without inhibitor;
- (c) lle-thiazolidide;
- (d) relative intensity;
- (e) 20 μ M lle-thiazolidide;
- (f) without inhibitor

Figure 2. HPLC analysis of the presence of GLP-1 metabolites in serum in the presence and in the absence of the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide *in vivo*.

Key:

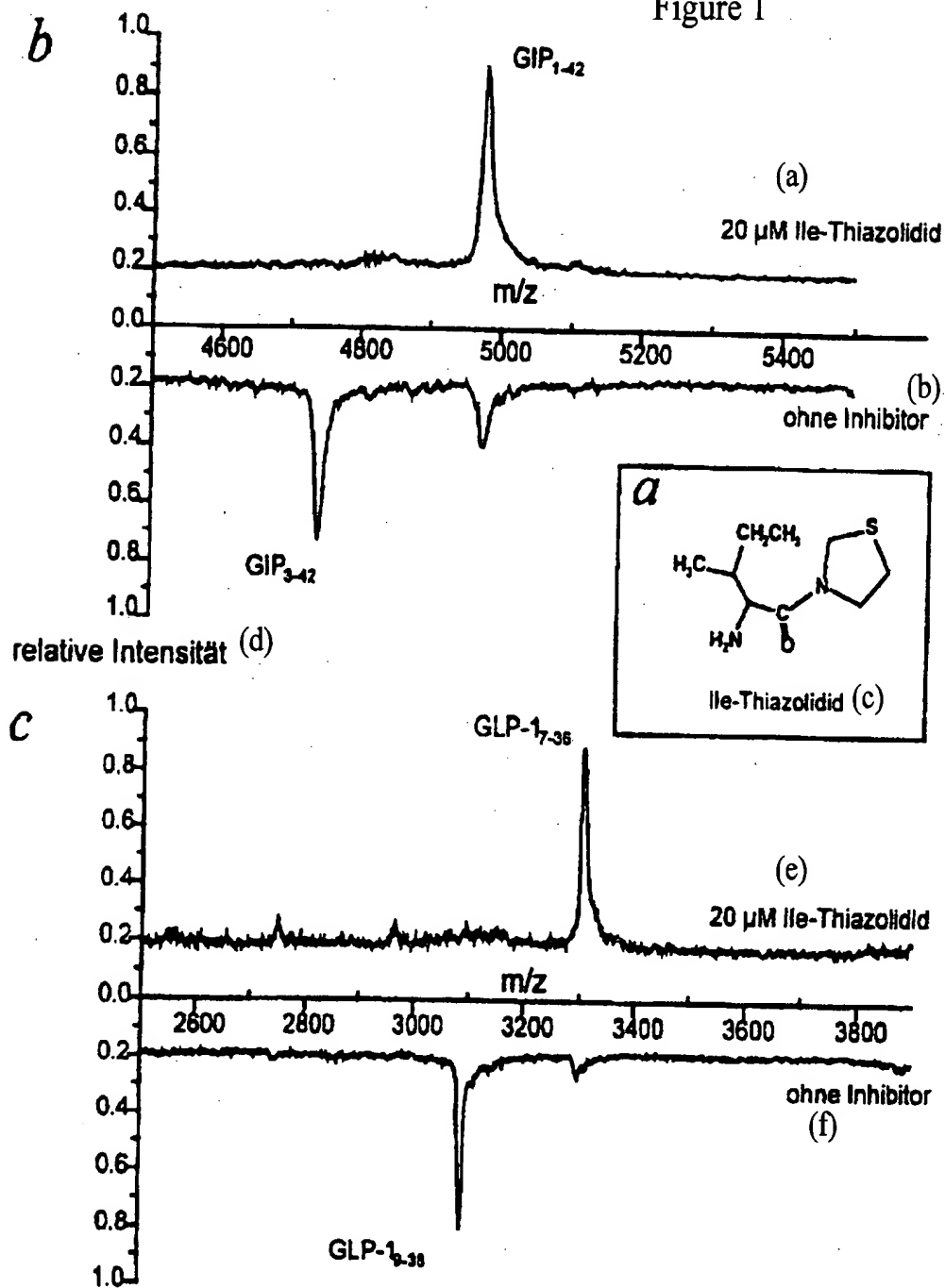
- (a) Controls;
- (b) Treated with inhibitor;
- (c) Elution time (min).

Figure 3. Influence of the DP IV inhibitor isoleucyl thiazolidide on various blood parameters in i.d. glucose stimulated rat.

Key:

- (a) rel. DP IV activity;
- (b) Inhibitor - [illegible];
- (c) Insulin;
- (d) Glucose conc. relative to normal;
- (e) Time (min).

Figure 1



Rel. cpm

Figure 2

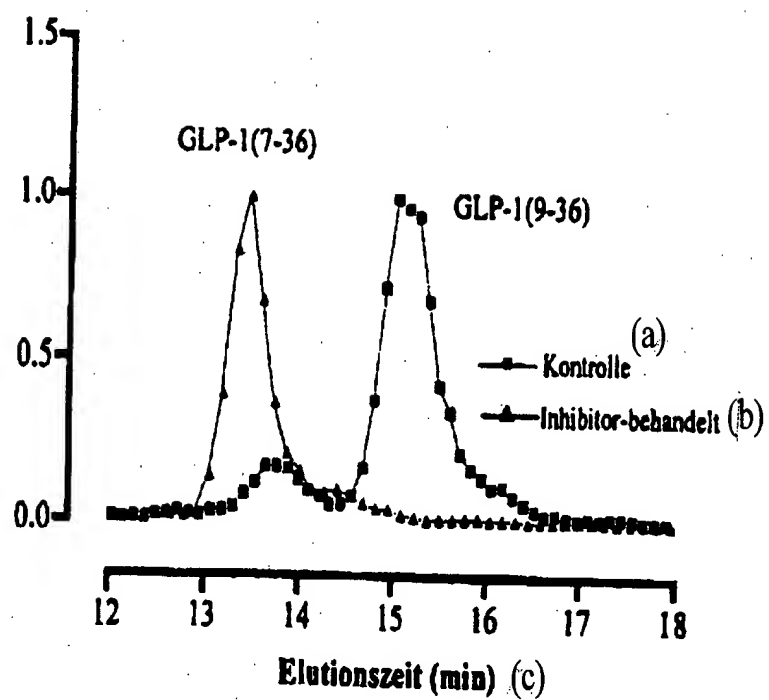


Figure 3

